

Estudos preliminares sobre o efeito da cafeína na duplicação cromossômica em plantas haplóides de cevada (*Hordeum vulgare* L.)

Foto: Sandra Mansur Scagliusi



Sandra Mansur Scagliusi¹
Deyse Grosselli²
Tiago Eloir Ruppenthal³
Adriana Zelinda Deon⁴



Introdução

Os métodos de obtenção de plantas haplóides vêm, cada vez mais, abrindo novas fronteiras e perspectivas na pesquisa e na busca de genes de interesse à agricultura, contribuindo de maneira direta e significativa ao melhoramento genético vegetal. Vários métodos já foram descritos como exemplos para obtenção de plantas haplóides, sendo a hibridização interespecífica ou intergenérica, a partenogênese e a androgênese, os mais utilizados (PALMER & KELLER, 2005). A cultura de micrósporos isolados (via androgênese) vem, aos poucos, substituindo os outros métodos de obtenção de plantas haplóides. No entanto, em cevada, a cultura de anteras ainda tem sido bastante utilizada, apesar de apresentar muitas limitações (alta frequência de plantas albinas e baixa responsividade de alguns genótipos). A planta obtida pela cultura de anteras, via androgênese, é haplóide, contendo em seu genoma, apenas um conjunto de cromossomos. As plantas haplóides possuem, de uma maneira

¹Pesquisador, Embrapa Trigo. Rodovia BR 285, Km 294, Cx.P. 451, 99001-970, Passo Fundo, RS. E-mail: mansur@cnpt.embrapa.br

²Acadêmica do Curso de Ciências Biológicas (Universidade de Passo Fundo – UPF)

³Acadêmico do Curso de Agronomia (Universidade de Passo Fundo – UPF)

⁴Bióloga (Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS)

geral, menor tamanho e menor número de perfilhos, produzindo espigas estéreis. A planta haplóide formada, que recupera seu nível de ploidia após duplicação dos cromossomos, é completamente homozigota e chamada de duplo-haplóide. O fenômeno de duplicação espontânea dos cromossomos em cevada é consideravelmente alto, chegando, em alguns casos, entre 50% e 80% das plantas geradas (SEGUÍ-SIMARRO & NUEZ, 2008; KAHIRIZI & MOHAMMADI, 2009). Entretanto, devido ao baixo número de plantas verdes obtidas pela cultura de anteras, o processo de duplicação espontânea não é suficiente para gerar a quantidade de plantas duplo-haplóides necessária ao programa de melhoramento. Assim, a duplicação dos cromossomos feita artificialmente se faz necessária. A colchicina é o alcalóide mais utilizado para duplicação induzida dos cromossomos (CASTILLO et al., 2009). Contudo, a busca por substâncias anti-mitóticas menos tóxicas, como a cafeína, pode ampliar a gama de opções na duplicação dos cromossomos.

Objetivo

Avaliar a eficiência da cafeína na duplicação cromossômica em plantas haplóides de cevada da cultivar BRS 195, originadas de cultura de anteras.

Material e métodos

A cultivar de cevada BRS 195 foi utilizada para a produção das plantas haplóides via cultura de anteras. A técnica de cultura de anteras consistiu das seguintes etapas: a) desenvolvimento das plantas em câmaras de crescimento com ambiente controlado, com fotoperíodo de 14 horas/luz; temperaturas de 18 °C (dia) e 14 °C (noite); b) observação das células (micrósporos) ao microscópio óptico para confirmar a fase uninucleada (intermediária ou tardia); c) coleta das espigas; d) pré-tratamento das espigas para promover a rota esporofítica dos micrósporos (10 dias / 4 °C); e) plaqueamento das anteras em meio de cultura FHGA, segundo protocolo descrito por Kasha et al. (2001); f) transferência das plântulas para tubos de ensaio, contendo Meio de Batata 2 de Regeneração (CHUANG et al., 1981); g) transferência das plantas para potes com vermiculita. Um total de 40 plantas haplóides foram podadas (parte aérea e raízes), divididas em dois blocos iguais e submetidas aos seguintes tratamentos: a) colchicina (0,25% Sigma, C-9754) + dimetilsulfóxido (1% Sigma, D-5879), considerado como tratamento padrão; b) cafeína (0,3 g/L, Sigma C-8960), conforme metodologia descrita por Thomas et al. (1997). As raízes das plantas foram mergulhadas em vasos de 1,5 L, contendo as soluções acima descritas, por três horas à temperatura ambiente. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente, utilizando-se um delineamento inteiramente casualizado, sendo cada planta uma unidade experimental, totalizando 20 repetições por tratamento.

Resultados e conclusão

Resultados preliminares mostraram diferenças significativas entre os dois tratamentos (Tukey, 5%), sendo que as plantas tratadas com colchicina apresentaram menor taxa de duplicação cromossômica. A identificação do nível de ploidia foi feita preliminarmente de maneira indireta, contando-se o número de espigas férteis por planta e o número de grãos formados em cada espiga. A cafeína, substância menos tóxica que a colchicina, mostrou ser mais eficaz na duplicação cromossômica de plantas haplóides de cevada. A Figura 1 mostra espigas de cevada originadas da cultura de anteras, contendo espigas férteis e estéreis. Ensaios posteriores deverão ser realizados, para se determinar e confirmar o nível de ploidia das plantas geradas, através da contagem do número de cromossomos em pontas de raízes.



Fig. 1. Espigas de cevada da cultivar BRS 195, originadas de plantas haplóides, obtidas pela cultura de anteras: a) espiga tratada com cafeína, mostrando um maior número de espiguetas férteis (setas); b) tratada com colchicina mostrando espiga parcialmente fértil, contendo espiguetas cheias (lado direito, setas) e vazias (lado esquerdo); c) tratada com colchicina, espiga totalmente estéril.

Referências bibliográficas

- CASTILLO, A. M.; CISTUÉ, L.; VALLÉS, M. P.; SORIANO, M. Chromosome doubling in monocots. In: TOURAEV, A.; FORSTER, B. P.; JAIN, S. M. (Ed.). **Advances in haploid production in higher plants**. New York: Springer Science, 2009. p. 329-338.
- CHUANG, C. C.; YANG, T. W.; CHIA, H. 1981. A set of potato media for wheat anther culture. In: SYMPOSIUM ON PLANT TISSUE CULTURE, 1978, Peking. **Proceedings...** Boston: Pitman Advanced Publishing Program, 1981. p. 51-56.
- KAHRIZI, D.; MOHAMMADI, R. Study of androgenesis and spontaneous chromosome doubling in barley (*Hordeum vulgare* L.) genotypes using isolated microspore culture. **Acta Agronomica Hungarica**, v. 57, p. 155-164, 2009.
- KASHA, K. J.; SIMION, E.; ORO, R.; YAO, Q. A.; HU, T. C.; CARLSON, A. R. An improved *in vitro* technique for isolated microspore culture of barley. **Euphytica**, v. 120, p. 379-385, 2001.
- PALMER, C. E.; KELLER, W. A. Overview of haploidy. In: PALMER, C. E.; KELLER, W. A.; KASHA, K. J. (Ed.). **Haploids in crop improvement II**. Berlin: Springer, 2005. p. 3-9. (Biotechnology in Agriculture and Forestry, 56).
- SEGUÍ-SIMARRO, J. M.; NUEZ, F. Pathways to doubled haploidy: chromosome doubling during androgenesis. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 120, p. 358-369, 2008.

THOMAS, J.; CHEN, Q.; HOWES, N. Chromosome doubling of haploids of common wheat with caffeine. **Genome**, v. 40, p. 552-558, 1997.



Trigo

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento



Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: **Leandro Vargas**

Anderson Santi, Antônio Faganello, Casiane Salete Tibola, Leila Maria Costamilan, Lisandra Lunardi, Maria Regina Cunha Martins, Sandra Maria Mansur Scagliusi, Sandro Bonow

Expediente

Referências bibliográficas: Maria Regina Martins

Editoração eletrônica: Márcia Barrocas Moreira Pimentel

SCAGLIUSI, S. M.; GROSSELLI, D.; RUPPENTHAL, T. E.; DEON, A. Z. **Estudos preliminares sobre o efeito da cafeína na duplicação cromossômica em plantas haplóides de cevada (*Hordeum vulgare* L.)**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2009. 9 p. html. (Embrapa Trigo. Documentos Online, 109). Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do109.htm>.